

## Instrukcja

# Cell-free AX DNA Mini

Zestaw do izolacji wolnokrążącego DNA (cell-free DNA/circulating free DNA) z osocza. Procedura z precipitacją DNA.  
Wielkość próbki: 100-500 µl osocza.

| numer katalogowy | wielkość     |
|------------------|--------------|
| 063-25           | 25 izolacji  |
| 063-100          | 100 izolacji |

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

### Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

# Spis treści

|                                                            |          |
|------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Zalety</b>                                              | <b>3</b> |
| <b>Opis</b>                                                | <b>3</b> |
| <b>Skład</b>                                               | <b>3</b> |
| <b>Dodatkowy sprzęt i odczynniki</b>                       | <b>4</b> |
| Niezbędne                                                  | 4        |
| Opcjonalne                                                 | 4        |
| <b>Referencje</b>                                          | <b>4</b> |
| <b>Przygotowanie materiału (osocze świeże lub mrożone)</b> | <b>4</b> |
| <b>Protokół izolacji</b>                                   | <b>5</b> |
| <b>Informacje bezpieczeństwa</b>                           | <b>7</b> |

## Zalety

- Otrzymanie DNA wysokiej czystości, wyeliminowanie zanieczyszczeń DNA komórkowym.
- Szybka i prosta procedura izolacji.
- Możliwość zawieszenia wyizolowanego DNA w dowolnej objętości wody jałowej lub buforu.

## Specyfikacja

|                                      |                                         |
|--------------------------------------|-----------------------------------------|
| format                               | minikolumna                             |
| pojemność złoża                      | 10 µg DNA                               |
| wielkość próbki                      | 100 - 500 µl osocza świeżego, mrożonego |
| objętość elucji                      | precypitacja                            |
| zastosowanie wyizolowanego materiału | qPCR, sekwencjonowanie                  |

## Opis

Cell-free AX DNA Mini jest zestawem przeznaczonym do izolacji pozakomórkowego DNA z osocza krwi (cfDNA), w tym również wolnego płodowego DNA z osocza ciężarnej (cffDNA) oraz pozakomórkowego DNA nowotworowego (ctDNA). Wysoka jakość wyizolowanego DNA pozwala na szerokie zastosowanie w metodach m.in. PCR, real-time PCR, next-generation sequencing. Analiza wybranych sekwencji cfDNA pozwala na nieinwazyjne testy prenatalne, wykrywanie oraz monitorowanie nowotworów i chorób autoimmunologicznych.

## Skład

| składnik                                      | 25 izolacji |            | 100 izolacji |            | przechowywanie |
|-----------------------------------------------|-------------|------------|--------------|------------|----------------|
|                                               | ilość       | nr kat.    | ilość        | nr kat.    |                |
| kolumny <b>Spin 10AX</b>                      | 25 szt.     | K-0006-25  | 100 szt.     | K-0006-100 | 4-8 °C         |
| <b>Probówki 2 ml</b>                          | 25 szt.     | K-PGR-25   | 100 szt.     | K-PGR-100  | 15-25 °C       |
| <b>Probówki 2 ml (zamykane)</b>               | 25 szt.     | K-PRP-25   | 100 szt.     | K-PRP-100  | 15-25 °C       |
| <b>L1.4 roztwór lizujący</b>                  | 15 ml       | K-L14-15   | 55 ml        | K-L14-55   | 15-25 °C       |
| <b>K2CF roztwór płuczący</b>                  | 35 ml       | K-K2CF-35  | 135 ml       | K-K2CF-135 | 15-25 °C       |
| <b>K3 roztwór elucyjny</b>                    | 12 ml       | K-K3-12    | 45 ml        | K-K3-45    | 15-25 °C       |
| <b>PM mieszanina precypitacyjna</b>           | 10 ml       | K-PM-10    | 40 ml        | K-PM-40    | 15-25 °C       |
| <b>Bufor Tris</b><br>(10 mM Tris-HCl, pH 8,5) | 2 ml        | K-TRIS-2   | 5 ml         | K-TRIS-5   | 15-25 °C       |
| <b>Proteinaza K</b>                           | 600 µl      | K-PRK-600B | 2 x 1,1 ml   | K-PRK-11A  | 15-25 °C       |

# Dodatkowy sprzęt i odczynniki

## Niezbędne

- jałowe probówki o pojemności 1,5 ml typu Eppendorf
- 70% etanol
- inkubator lub termoblok 50 °C
- worteks
- mikrowirówka

## Opcjonalne

- Bufor TE (nr kat. 297-100)
- Woda jałowa ([nr kat. 003-075, 003-25](#))

## Referencje

1. Orzińska A., Purchla-Szepiła S., Krzemieszewska M., Stefanska-Kazmierczak A., Dąbrowski S., Dębska M., Kopeć I., Uhrynowska M., Guz K. *Comparison of non-invasive prenatal testing of a fetal antigen genotype using different isolation methods*, Vox Sanguinis International Journal of Blood Transfusion Medicine, 2020; 115:s.295.

## Przygotowanie materiału (osocze świeże lub mrożone)

1. Przenieść **100-500 µl osocza** do probówki 1,5 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Do każdej próbki dodać roztwór lizujący **L1.4** w objętości równej użytej objętości osocza oraz **20 µl proteiny K**.
3. Worteksować przez **20 s**.
4. Inkubować przez **20 min** w temp. **50 °C**. Podczas inkubacji próbkę należy od czasu do czasu worteksować.
5. Przejsć do punktu 1. [protokołu izolacji](#).

## Protokół izolacji

1. **Uwaga.** Maksymalna objętość próbki nakładanej jednorazowo na kolumnę nie może przekraczać **700 µl**.  
Próbkę nanieść na kolumnę **Spin 10AX**.
2. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**. Wylać przesącz.
3. Jeśli objętość próbki z punktu 1. przekraczała **700 µl**, nanieść resztę próbki na kolumnę i wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**. Wylać przesącz.
4. Umieścić kolumnę Spin 10AX w **nowej probówce 2 ml (K-PGR-25 w zestawie)**.
5. Nanieść na kolumnę Spin 10AX **600 µl** roztworu płuczającego **K2CF**.
6. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**.
7. Wylać przesącz i ponownie umieścić kolumnę Spin 10AX w tej samej probówce.
8. Nanieść na kolumnę Spin 10AX **600 µl** roztworu płuczającego **K2CF**.
9. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**.
10. Wylać przesącz i umieścić kolumnę Spin 10AX w **probówce 2 ml zamykanej (K-PRP-25 w zestawie)**.
11. Nanieść na kolumnę Spin 10AX **200 µl** roztworu elucyjnego **K3**.
12. Pozostawić na **2 min** w **temp. pokojowej**.
13. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**.
14. Nanieść na kolumnę Spin 10AX **200 µl** roztworu elucyjnego **K3**.
15. Pozostawić na **1 min** w **temp. pokojowej**.
16. Wirować przez **1 min** przy **8000 RPM (6000 x g)**.

17. Usunąć kolumnę **Spin 10AX**.
18. **Uwaga.** Mieszanina precypitacyjna PM zawiera dodatkowo wzmacniacz precypitacji, dlatego przed użyciem należy ją wymieszać poprzez kilkakrotne odwracanie butelki.  
Do eluatów dodać po **320 µl** mieszaniny precypitacyjnej **PM**.
19. Wymieszać i wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM (9000 x g)**.
20. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.  
**Uwaga.** W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej probówki, tak aby można było go odzyskać.
21. Dodać po **500 µl 70% etanolu**.
22. Wymieszać i wirować przez **5 min** przy **10 000 RPM (9000 x g)**.
23. Usunąć supernatant. Osady DNA suszyć przez **10 min** w **temp. pokojowej**.  
**Uwaga.** Jeżeli na ściankach probówki znajdują się resztki alkoholu, należy je osuszyć kawałkiem jałowej waty (doskonale nadają się do tego patyczki higieniczne oraz pałeczki do pobierania wymazów).
24. Zawiesić osad DNA w odpowiedniej ilości buforu **Tris** (w zestawie), buforu **TE** lub **wody jałowej wolnej od nukleaz** (nie ma w zestawie).  
**Informacja.** Niebieska barwa osadu umożliwia śledzenie procesu rozpuszczania DNA.
25. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. **4-8 °C** do czasu dalszych analiz.

# Informacje bezpieczeństwa



**NIEBEZPIECZEŃSTWO**

## Proteinaza K

H315 Działa drażniąco na skórę.  
 H319 Działa drażniąco na oczy.  
 H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.  
 H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.  
 P261 Unikać wdychania pyłu.  
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.  
 P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



**UWAGA**

## L1.4 roztwór lizujący

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.  
 H315 Działa drażniąco na skórę.  
 H319 Działa drażniąco na oczy.  
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



**NIEBEZPIECZEŃSTWO**

## K2CF roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.  
 H319 Działa drażniąco na oczy.  
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.  
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.  
 P261 Unikać wdychania par.  
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



**NIEBEZPIECZEŃSTWO**

## K3 roztwór elucyjny

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.  
 H319 Działa drażniąco na oczy.  
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.  
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.  
 P261 Unikać wdychania par.  
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



**NIEBEZPIECZEŃSTWO**

## PM mieszanina precypitacyjna

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.  
 H319 Działa drażniąco na oczy.  
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.  
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.  
 P261 Unikać wdychania par.  
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk  
tel. 883 323 761, 600 776 268  
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

wersja 2023-2

